

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-343300

(43)Date of publication of application : 14.12.1999

(51)Int.Cl.

C07K 16/44  
 C07C215/28  
 C07C323/12  
 C07C323/25  
 C07C323/29  
 C07C323/41  
 C12N 5/10  
 C12N 15/02  
 C12P 21/08  
 G01N 33/53  
 G01N 33/531  
 G01N 33/577  
 // A61K 39/00

(21)Application number : 11-063948

(71)Applicant : FUJITA TETSURO

TAITO CO LTD

YOSHITOMI PHARMACEUT IND LTD

(22)Date of filing : 10.03.1999

(72)Inventor : FUJITA TETSURO

UCHIDA HIDEJI

KONO TAKEYUKI

HIROSE RYOJI

(30)Priority

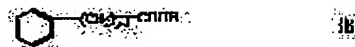
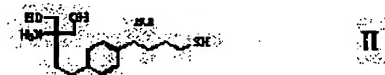
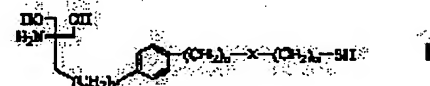
Priority number : 10 63593 Priority date : 13.03.1998 Priority country : JP

(54) NEW HAPTEN, ANTIBODY RECOGNIZING THE HAPTEN AND IMMUNOLOGICAL DETERMINATION USING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a new compound having an immunosuppressive site of a specific compound and useful for a quick, simple and sensitive immunological determination of the specific compound existing in a biospecimen, etc., at an extremely low concentration.

SOLUTION: The objective compound is expressed by formula I ((k), (m) and (n) are each 1-20; X is direct bond, CONH, O or the like), e.g. the compound of formula II. The compound of formula I can be produced e.g. by using a compound of formula III ((p) is 1-20) (e.g. 4-phenylbutyric acid) as a starting raw material, subjecting to successive esterification, acylation, reduction and iodination, condensing with a 2-(N-substituted)-aminomalonic acid ester such as diethylacetamide malonate and carrying out the reduction, acetalization, reaction with p-toluenesulfonyl chloride, etc., thioacylation and hydrolysis. The compound is useful for the determination of 2-amino-2-[2-(4-octylphenyl) ethyl]propane-1,3-diol hydrochloride.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-343300

(43) 公開日 平成11年(1999)12月14日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>  
C 0 7 K 16/44  
C 0 7 C 215/28  
323/12  
323/25  
323/29

識別記号

F I

C 0 7 K 16/44  
C 0 7 C 215/28  
323/12  
323/25  
323/29

審査請求 未請求 請求項の数30 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-63948  
(22) 出願日 平成11年(1999) 3 月10日  
(31) 優先権主張番号 特願平10-63593  
(32) 優先日 平10(1998) 3 月13日  
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 598034177  
藤多 哲朗  
京都府向日市鶏冠井町大極殿40番地23  
(71) 出願人 000204354  
台糖株式会社  
東京都中央区日本橋大伝馬町 7 番 5 号  
(71) 出願人 000006725  
吉富製菓株式会社  
大阪府大阪市中央区平野町 2 丁目 6 番 9 号  
(72) 発明者 藤多 哲朗  
京都府向日市鶏冠井町大極殿40番地23  
(74) 代理人 弁理士 高島 一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規ハプテン、それを認識する抗体およびそれらを用いた免疫学的測定法

(57) 【要約】

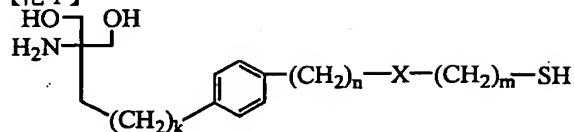
【解決手段】 新規 2-アミノ-2-(アリアルアルキル)-1, 3-ジオール基含有化合物、それをハプテン基として含む免疫原性を有する複合体、2-アミノ-2-(アリアルアルキル)-1, 3-ジオール基に親和性を示す抗体、該抗体を用いる 2-アミノ-2-(アリアルアルキル)-1, 3-ジオール基含有化合物、特に F T Y 7 2 0 物質の測定方法およびそのためのキット。

【効果】 本発明によれば、検体中の F T Y 7 2 0 物質を簡便且つ高感度に検出定量することができ、移植における拒絶反応の持続的抑制および自己免疫疾患の治療において有用である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】 一般式

## 【化1】



(式中、k、mおよびnはそれぞれ独立して1～20の整数であり、Xは直接結合、 $-\text{CONH}-$ 、 $-\text{O}-$ または $-\text{NH}-$ を表す)により表されるチオール化合物またはその保護体あるいはそれらの塩。

【請求項2】 式中、kが1～3の整数、mおよびnがそれぞれ独立して1～8の整数であり、Xが直接結合を表す請求項1記載の化合物またはその塩。

【請求項3】 式中、kが1～3の整数、mおよびnがそれぞれ独立して1～4の整数であり、Xが直接結合を表す請求項1記載の化合物またはその塩。

【請求項4】 式中、kが1、mおよびnがそれぞれ独立して1～4の整数であり、Xが直接結合を表す請求項1記載の化合物またはその塩。

【請求項5】 2-アミノ-2-(アリールアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物および免疫学上許容される担体を含む免疫原性を有する複合体。

【請求項6】 2-アミノ-2-(アリールアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基のアルキル基が2～4個の炭素原子を有し、および/またはアリール基がフェニルおよび炭素数2～8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキルによって置換されたフェニルからなる群より選択されるものである請求項5記載の免疫原性を有する複合体。

【請求項7】 2-アミノ-2-(アリールアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基が2-アミノ-2-(2-フェニルエチル)プロパン-1, 3-ジオール基または2-アミノ-2-(2-(炭素数2～8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオール基である請求項5記載の免疫原性を有する複合体。

【請求項8】 2-アミノ-2-(アリールアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基に対して親和性を有する抗体。

【請求項9】 2-アミノ-2-(アリールアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基のアルキル基が2～4個の炭素原子を有し、および/またはアリール基がフェニルおよび炭素数2～8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキルによって置換されたフェニルからなる群より選択されるものである請求項8記載の抗体。

【請求項10】 2-アミノ-2-(アリールアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基が2-アミノ-2-(2-フェニルエチル)プロパン-1, 3-ジオール基

または2-アミノ-2-(2-(炭素数2～8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオール基である請求項8記載の抗体。

【請求項11】 モノクローナル抗体である請求項8～10のいずれかに記載の抗体。

【請求項12】 下記(a)～(f)の工程により取得することができるモノクローナル抗体：

(a) 2-アミノ-2-(アリールアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物と免疫学上許容される担体を反応させて免疫原性を有する複合体を生成させ、

(b) 該免疫原性を有する複合体で哺乳動物を1回または数回免疫して2-アミノ-2-(アリールアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基に対して親和性を有する抗体を産生させ、

(c) 該哺乳動物から抗体産生細胞を採取し、

(d) 該抗体産生細胞を株化させ、

(e) 該株化細胞から2-アミノ-2-(アリールアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基に対して親和性を有するモノクローナル抗体を産生する細胞をクローン化し、

(f) 該クローン化された細胞株から該モノクローナル抗体を採取する。

【請求項13】 2-アミノ-2-(アリールアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基のアルキル基が2～4個の炭素原子を有し、および/またはアリール基がフェニルおよび炭素数2～8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキルによって置換されたフェニルからなる群より選択されるものである請求項12記載のモノクローナル抗体。

【請求項14】 2-アミノ-2-(アリールアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基が2-アミノ-2-(2-フェニルエチル)プロパン-1, 3-ジオール基または2-アミノ-2-(2-(炭素数2～8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル)エチル)プロパン-1, 3-ジオール基である請求項12記載のモノクローナル抗体。

【請求項15】 請求項12～14のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマ。

【請求項16】 2-アミノ-2-(アリールアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物を、請求項8～14のいずれかに記載の抗体を用いて検出することを特徴とする、生体試料中の2-アミノ-2-(アリールアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の測定方法。

【請求項17】 下記(a)～(c)の工程を含む生体試料中の2-アミノ-2-(アリールアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の測定方法：

(a) 固相化された請求項8～14のいずれかに記載の抗体に、生体試料と、標識された2-アミノ-2-(アリ

ールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物とを競合的に反応させた後、

(b) 固相と液相とを分離し、

(c) その一方に存在する標識量を測定する。

【請求項 18】 下記(a)～(d)の工程を含む生体試料中の 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の測定方法:

(a) 請求項 8～14 記載のいずれかに記載の抗体に、生体試料と、標識された 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物とを競合的に反応させ、

(b) 該反応液を該抗体に対して親和性を有する固相化された二次抗体とさらに反応させた後、

(c) 固相と液相とを分離し、

(d) その一方に存在する標識量を測定する。

【請求項 19】 下記(a)～(d)の工程を含む生体試料中の 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の測定方法:

(a) 生体試料と、2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基に対して親和性を有する標識された抗体とを反応させ、

(b) 該反応液を、固相化された 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物とさらに反応させた後、

(c) 固相と液相とを分離し、

(d) その一方に存在する標識量を測定する。

【請求項 20】 下記(a)～(f)の工程を含む生体試料中の 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の測定方法:

(a) 生体試料と、請求項 8～14 のいずれかに記載の抗体とを反応させ、

(b) 該反応液を、固相化された 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物とさらに反応させた後、

(c) 固相と液相とを分離し、

(d) 固相に結合した抗体と、該抗体に対して親和性を有する標識された二次抗体とを反応させ、

(e) 液相を除去した後、

(f) 該固相上の標識量を測定する。

【請求項 21】 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の体液中レベルの測定方法である請求項 16～20 のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基が 2-アミノ-2-(2-フェニルエチル) プロパン-1, 3-ジオール基または 2-アミノ-2-(2-(炭素数 2～8 個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル) エチル) プロパン-1, 3-ジオール基である請求項 16～21 のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】 標識が酵素、蛍光物質および放射性同位元素からなる群より選択される請求項 17～22 のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】 下記(a) および(b)を含む生体試料中の 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物測定用キット。

(a) 請求項 8～14 のいずれかに記載の抗体

(b) 標識された 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物。

【請求項 25】 さらに請求項 8～14 のいずれかに記載の抗体に対して親和性を有する二次抗体を含む請求項 24 記載のキット。

【請求項 26】 下記(a) および(b)を含む生体試料中の 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物測定用キット。

(a) 標識された請求項 8～14 のいずれかに記載の抗体

(b) 固相化可能な 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物

【請求項 27】 下記(a)～(c)を含む生体試料中の 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物測定用キット。

(a) 固相化可能な 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物

(b) 請求項 8～14 のいずれかに記載の抗体

(c) 該抗体に対して親和性を有する標識された二次抗体

【請求項 28】 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の体液中レベルの測定用キットである請求項 24～27 のいずれかに記載のキット。

【請求項 29】 2-アミノ-2-(アリアルアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基が 2-アミノ-2-(2-フェニルエチル) プロパン-1, 3-ジオール基または 2-アミノ-2-(2-(炭素数 2～8 個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル) エチル) プロパン-1, 3-ジオール基である請求項 24～28 のいずれかに記載のキット。

【請求項 30】 標識が酵素、蛍光物質および放射性同位元素からなる群より選択される請求項 24～29 のいずれかに記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、免疫抑制活性を有する新規低分子化合物、該低分子化合物の活性基に対して特異的な親和性を有する抗体、該抗体を用いた生体試料中の該低分子化合物の測定方法、並びにそのためのキットに関する。

【0002】

【従来の技術】 2-アミノ-2-[2-(4-オクチルフェニル) エチル] プロパン-1, 3-ジオール塩酸塩(以下、FTY720 と称する場合もある)、その医薬

上許容される塩、塩基またはそれらの水和物は、安全性の高い優れた免疫抑制作用を示し、臓器または骨髄の移植時に生じる拒絶反応を抑制するとともに、関節リウマチ等の自己免疫疾患、アトピー性皮膚炎、喘息などの予防および治療に有効であることが知られている（特許第2579602号公報）。FTY720は微量で非常に強力な免疫抑制作用を有するため、例えば、臓器移植等の移植における拒絶反応を有効且つ持続的に抑制するには、生体投与後の該化合物の血中濃度を簡便且つ高感度にモニタリングする技術が必要である。

#### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】生体試料中に微量含まれる低分子物質の測定法としては、ガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーなどが従来より用いられているが、これらの分析法には、(1)微量濃度の薬理活性物質を測定するには感度が不十分である、

(2)操作が煩雑である、(3)大型装置を必要とする等の問題点があった。そのため、微量濃度のFTY720を簡便且つ高感度に定量する測定方法は未だに確立されていない。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】したがって、本発明の目的は、生体試料等に含まれる微量濃度のFTY720を迅速、簡便且つ高感度に測定することができるFTY720の新規測定方法、並びに該測定方法に用いるためのキットを提供することである。

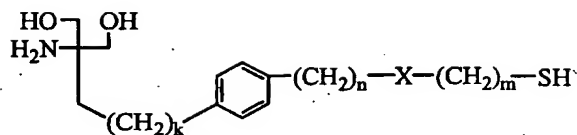
【0005】本発明者らは、抗原抗体反応を利用した高感度免疫測定法に着目し、FTY720の免疫抑制活性部位である2-アミノ-2-（2-フェニルエチル）プロパン-1, 3-ジオール基を含む化合物として、2-アミノ-2-〔2-（4-（4-メルカプトブチル）フェニル）エチル〕プロパン-1, 3-ジオール塩酸塩（AMPD）等の2-アミノ-2-（アリールアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物を新規に合成し、該新規化合物をアルブミン等の適当な担体に結合して免疫原性を有する複合体（immunogenic conjugate）を作製した。次いで、該複合体を感作抗原として、2-アミノ-2-（アリールアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基のある部位をハプテン基として認識するポリクローナルおよびモノクローナル抗体をそれぞれ取得することに成功した。さらに、本発明者らは、該抗体を用いて生体試料、特に血液等の体液中の2-アミノ-2-（アリールアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物を高感度に検出できることを確認して、本発明を完成するに至った。

【0006】すなわち、本発明は以下の通りである。

#### (1)一般式

#### 【0007】

#### 【化2】



【0008】（式中、kは1～20、好ましくは1～3の整数、就中1であり、mおよびnはそれぞれ独立して1～20の整数、好ましくは1～8の整数、さらに好ましくは1～4の整数であり、Xは直接結合、-CONH-、-O-または-NH-、好ましくは直接結合を表す）により表されるチオール化合物またはその保護体あるいはそれらの塩。

(2) 2-アミノ-2-（アリールアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基、好ましくはアルキル基が2～4個の炭素原子を有し、および／またはアリール基がフェニルおよび炭素数2～8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキルによって置換されたフェニルからなる群より選択される2-アミノ-2-（アリールアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基、就中2-アミノ-2-（2-フェニルエチル）プロパン-1, 3-ジオール基または2-アミノ-2-（2-（炭素数2～8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル）エチル）プロパン-1, 3-ジオール基、並びに免疫学上許容される担体を含む、免疫原性を有する複合体。

(3) 2-アミノ-2-（アリールアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基、好ましくはアルキル基が2～4個の炭素原子を有し、および／またはアリール基がフェニルおよび炭素数2～8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキルによって置換されたフェニルからなる群より選択される2-アミノ-2-（アリールアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基、就中2-アミノ-2-（2-フェニルエチル）プロパン-1, 3-ジオール基または2-アミノ-2-（2-（炭素数2～8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル）エチル）プロパン-1, 3-ジオール基に対して親和性を有する抗体、好ましくはモノクローナル抗体。

(4) 下記の(a)～(f)の工程により取得することができる、2-アミノ-2-（アリールアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基に対して親和性を有するモノクローナル抗体：

(a) 2-アミノ-2-（アリールアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物と免疫学上許容される担体を反応させて免疫原性を有する複合体を生成させ、  
(b) 該免疫原性を有する複合体で哺乳動物を1回または数回免疫して2-アミノ-2-（アリールアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基に対して親和性を有する抗体を産生させ、  
(c) 該哺乳動物から抗体産生細胞を採取し、  
(d) 該抗体産生細胞を株化させ、  
(e) 該株化細胞から2-アミノ-2-（アリールアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基に対して親和性を有するモノクロー

ナル抗体を産生する細胞をクローン化し、(f) 該クローン化された細胞株から該モノクローナル抗体を採取する、好ましくは2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基が、2-アミノ-2-（2-フェニルエチル）プロパン-1, 3-ジオール基または2-アミノ-2-（2-（炭素数2～8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル）エチル）プロパン-1, 3-ジオール基である該モノクローナル抗体。

(5) 上記(3)または(4)のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマ。

(6) 生体試料中の2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物を、上記(3)または(4)の抗体を用いて検出することを特徴とする、生体試料中の2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の測定方法。

(7) 下記(a)～(c)の工程を含む生体試料中の2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の測定方法：

(a) 固相化された上記(3)または(4)の抗体に、生体試料と、標識された2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物とを競合的に反応させた後、(b) 固相と液相とを分離し、(c) その一方に存在する標識量を測定する。

(8) 下記(a)～(d)の工程を含む生体試料中の2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の測定方法：

(a) 上記(3)または(4)の抗体に、生体試料と、標識された2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物とを競合的に反応させ、(b) 該反応液を該抗体に対して親和性を有する固相化された二次抗体とさらに反応させた後、(c) 固相と液相とを分離し、(d) その一方に存在する標識量を測定する。

(9) 下記(a)～(d)の工程を含む生体試料中の2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の測定方法：

(a) 生体試料と標識された上記(3)または(4)の抗体とを反応させ、(b) 該反応液を、固相化された2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物とさらに反応させた後、(c) 固相と液相とを分離し、(d) その一方に存在する標識量を測定する。

(10) 下記(a)～(f)の工程を含む生体試料中の2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の測定方法：

(a) 生体試料と、上記(3)または(4)の抗体とを反応させ、(b) 該反応液を、固相化された2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基

含有化合物とさらに反応させた後、(c) 固相と液相とを分離し、(d) 固相に結合した抗体と、該抗体に対して親和性を有する標識された二次抗体とを反応させ、(e) 液相を除去した後、(f) 該固相上の標識量を測定する。

(11) 2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の体液中レベルの測定方法である上記(6)～(10)のいずれかの方法。

(12) 2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基が、2-アミノ-2-（2-フェニルエチル）プロパン-1, 3-ジオール基または2-アミノ-2-（2-（炭素数2～8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル）エチル）プロパン-1, 3-ジオール基である上記(6)～(11)のいずれかの方法。

(13) 標識が酵素、蛍光物質または放射性同位元素である上記(7)～(12)のいずれかの方法。

(14) 下記(a) および(b)を含む生体試料中の2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物測定用キット。

(a) 上記(3)または(4)の抗体

(b) 標識された2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物

(15) さらに上記(3)または(4)の抗体に対して親和性を有する二次抗体を含む上記(14)のキット。

(16) 下記(a) および(b)を含む生体試料中の2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物測定用キット。

(a) 標識された上記(3)または(4)の抗体

(b) 固相化可能な2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物

(17) 下記(a)～(c)を含む生体試料中の2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物測定用キット。

(a) 固相化可能な2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物

(b) 上記(3)または(4)の抗体

(c) 該抗体に対して親和性を有する標識された二次抗体

(18) 2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の体液中レベルの測定用キットである上記(14)～(17)のいずれかのキット。

(19) 2-アミノ-2-（アリアルアルキル）プロパン-1, 3-ジオール基が、2-アミノ-2-（2-フェニルエチル）プロパン-1, 3-ジオール基または2-アミノ-2-（2-（炭素数2～8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル）エチル）プロパン-1, 3-ジオール基である上記(14)～(18)のいずれかのキット。

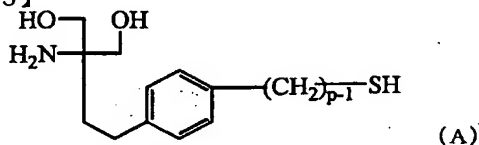
(20) 標識が酵素、蛍光物質または放射性同位元素である上記(14)～(19)のいずれかのキット。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の新規化合物のうち、特に好ましい化合物は、一般に下式で表される化合物またはその塩である（以下、総称してAMPD物質という場合もある）。

【0010】

【化3】



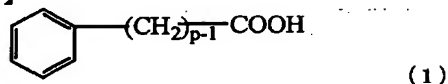
【0011】（式中、pは1～20、好ましくは4～8の整数である）

【0012】塩としては、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩等の無機酸との塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、リンゴ酸塩、酒石酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、シュウ酸塩等が挙げられる。本化合物はO位および／またはN位がアシル基（アセチル、クロロアセチル、トリフルオロアセチル等）、アルコキシカルボニル（第3級ブトキシカルボニル等）、アルキリデン（イソプロピリデン等）、トリアルキシルシリル（トリブチルシリル等）により保護されていてもよい。これら保護体は合成原料として用いられる。本化合物はFTY720同様、2-アミノ-2-（2-フェニルエチル）プロパン-1, 3-ジオール基を有する。また、チオール基を有するため、免疫原性を有する複合体の作製の際に、担体となる物質と容易に架橋形成させることができる。

【0013】AMPD物質は、例えば、下式で示される化合物（1）を出発物質として、以下に示す一連の工程により調製することができるが、それに限定されない。

【0014】

【化4】



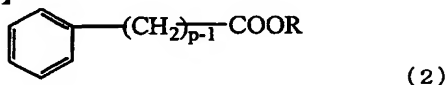
【0015】（式中、pは1～20の整数を示す）

【0016】工程1

化合物（1）をパラトルエンスルホン酸、硫酸、ジエチルエーテル三フッ化ホウ素付加物等の存在下、第1級アルコール（メタノール、無水エタノール、プロパノール等）と60～80℃、1～2時間反応させてエステル化し、化合物（2）を得る。

【0017】

【化5】



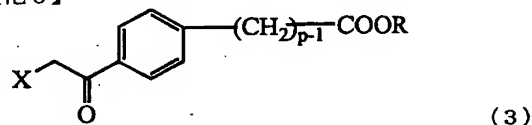
【0018】（式中、Rはメチル、エチル、プロピル等の低級アルキルを、pは1～20の整数を示す）

【0019】工程2

化合物（2）を塩化アルミニウム、塩化亜鉛、ジエチルエーテル三フッ化ホウ素付加物等の存在下、プロモアセチルクロリド等のアシル化剤を用いて-20～40℃で1～2時間反応させてアシル化し、化合物（3）を得る。溶媒としては、ジクロロメタン、ジクロロエタン、クロホルム、ニトロベンゼン、二硫化炭素等が使用できる。

【0020】

【化6】



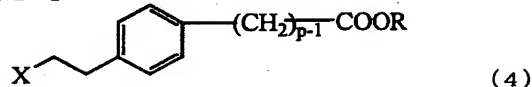
【0021】（式中、Xは臭素、塩素またはフッ素、Rはメチル、エチル、プロピル等の低級アルキルを、pは1～20の整数を示す）

【0022】工程3

化合物（3）をトリエチルシランおよびトリフルオロ酢酸（TFA）の存在下、-10～40℃で2～4時間反応させて還元し、化合物（4）を得る。

【0023】

【化7】



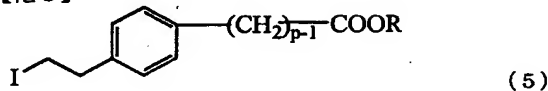
【0024】（式中、Xは臭素、塩素またはフッ素、Rはメチル、エチル、プロピル等の低級アルキルを、pは1～20の整数を示す）

【0025】工程4

化合物（4）をヨウ化ナトリウムで処理し、50～90℃で2～6時間反応させてヨウ化し、化合物（5）を得る。溶媒としては、2-ブタノン、メチルエチルケトン、アセトン等が使用できる。

【0026】

【化8】



【0027】（式中、Rはメチル、エチル、プロピル等の低級アルキルを、pは1～20の整数を示す）

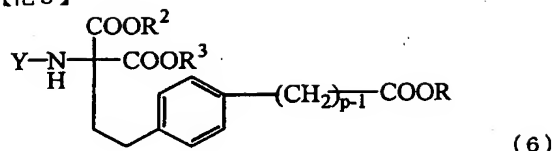
【0028】工程5

化合物（5）を水素化ナトリウム、ナトリウムエトキシド等の存在下、2-（N-置換）-アミノマロン酸エステルと40～100℃で1～8時間反応させて縮合し、化合物（6）を得る。溶媒としては、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、エタノール、トルエン等が使用できる。

【0029】



【化9】



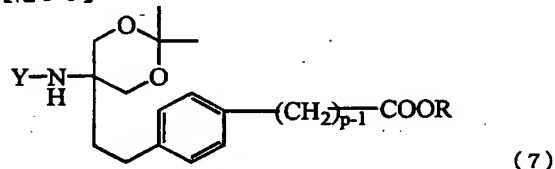
【0030】(式中、Yはアセチル、第3級ブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル等を、R、R²、R³はそれぞれ同一または異なって、メチル、エチル、プロピル等の低級アルキルを、pは1~20の整数を示す)

【0031】工程6

化合物(6)を水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カルシウム等と0~60℃、2~8時間反応させて還元し、さらにその反応混合物をp-トルエンスルホン酸、硫酸、ジエチルエーテル三フッ化ホウ素付加物等の存在下、2-ジメトキシプロパンまたはアセトンと0~80℃で1~24時間反応させてアセタール化し、化合物(7)および(8)を得る。還元反応の溶媒としては、エタノール、メタノール、テトラヒドロフラン等が使用できる。

【0032】

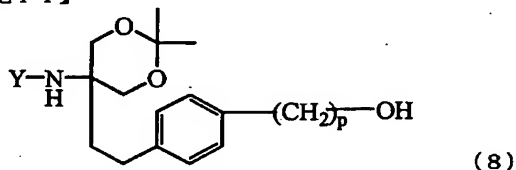
【化10】



【0033】(式中、Yはアセチル、第3級ブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル等を、Rはメチル、エチル、プロピル等の低級アルキルを、pは1~20の整数を示す)

【0034】

【化11】



【0035】(式中、Yはアセチル、第3級ブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル等を、pは1~20の整数を示す)

【0036】工程7

化合物(7)を水素化ホウ素リチウム、水酸化リチウムアルミニウム、水素化ホウ素ナトリウム等と-20~60℃で0.5~4時間反応させて還元し、化合物(8)を得る。溶媒としては、ジエチルエーテル、テトラヒド

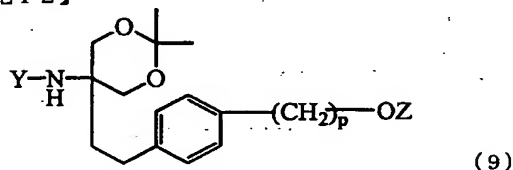
ロフラン、メタノール、エタノール等が使用できる。

【0037】工程8

化合物(8)をピリジン、トリエチルアミン、ヘキサメチルホスホルアミド等の存在下、p-トルエンスルホンクロリド、メタンスルホンクロリド等と-20~60℃で1~24時間反応させて化合物(9)を得る。溶媒としては、ジクロロメタン、ジクロロエタン、トルエン等が使用できる。

【0038】

【化12】



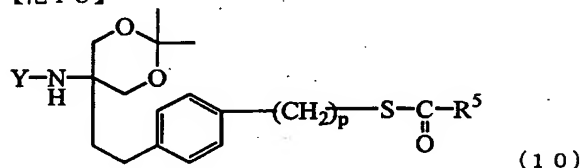
【0039】(式中、Yはアセチル、第3級ブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル等を、Zはトルエンスルホニル、メタンスルホニル等を、pは1~20の整数を示す)

【0040】工程9

化合物(9)をチオ酢酸カリウム、チオプロピオン酸カリウム、チオブタン酸カリウム等と60~100℃で0.5~4時間反応させてチオアシル化し、化合物(10)を得る。

【0041】

【化13】



【0042】(式中、Yはアセチル、第3級ブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル等を、R⁵はメチル、エチル、プロピル等の低級アルキルを、pは1~20の整数を示す)

【0043】工程10

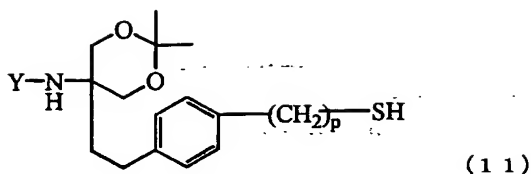
化合物(10)を塩酸、硫酸等の存在下、20~100℃で1~10時間反応させて加水分解し、化合物(A)の塩として化合物(12)である塩酸塩やその他硫酸塩等を得る。溶媒としては、メタノール、エタノール、水等が使用できる。

【0044】工程11

化合物(10)を水酸化ナトリウム、水酸化リチウム等の存在下、0~60℃で0.1~5時間反応させて加水分解し、化合物(11)を得る。溶媒としては、メタノール、エタノール等が使用できる。

【0045】

【化14】



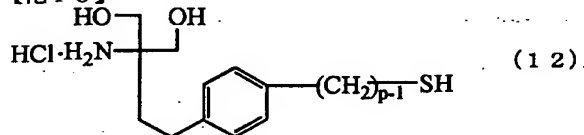
【0046】(式中、Yはアセチル、第3級ブトキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル等を、pは1~20の整数を示す)

【0047】工程12

化合物(11)を塩酸、硫酸等の存在下、20~100℃で1~10時間反応させて加水分解し、化合物(A)の塩として化合物(12)である塩酸塩やその他硫酸塩等を得る。溶媒としては、メタノール、エタノール、水等が使用できる。

【0048】

【化15】



【0049】(式中、pは1~20の整数を示す)

【0050】FTY720や本発明のAMPD物質は低分子化合物であるため、免疫原性、すなわち抗体産生誘導能がないか、または非常に低い。したがって、本発明の抗体を調製するためには、2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1,3-ジオール基、好ましくは2-アミノ-2-(2-フェニルエチル)プロパン-1,3-ジオール基または2-アミノ-2-(2-(炭素数2~8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル)エチル)プロパン-1,3-ジオール基を含む化合物、就中FTY720やAMPD物質を、例えばマレイミド法などの常法を用いて免疫学上許容される担体に結合して免疫原性を有する複合体もしくは免疫原性がより高められた複合体、すなわち人工抗原を作製する必要がある。

【0051】本発明はまた、上記方法により製造される、2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1,3-ジオール基に対して親和性を有する抗体の産生誘導能を有する複合体を提供する。該複合体は、ハプテン基含有領域としての2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1,3-ジオール基含有化合物、および免疫学上許容される担体からなる。2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1,3-ジオール基含有化合物として、好ましくは、アルキル基が2~4個の炭素原子を有し、および/またはアリアル基がフェニルおよび炭素数2~8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキルによって置換されたフェニルからなる群より選択される2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-

1,3-ジオール基を含む化合物、就中2-アミノ-2-(2-フェニルエチル)プロパン-1,3-ジオール基または2-アミノ-2-(2-(炭素数2~8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル)エチル)プロパン-1,3-ジオール基を含む化合物が挙げられる。また、免疫学上許容される担体としては、例えばウシ血清アルブミン(BSA)、卵白アルブミン、ゼラチン、ヘモシアニン等の高分子量タンパク質の他、赤血球、多糖体等が挙げられるが特に制限はない。

【0052】本発明の抗体は、2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1,3-ジオール基に対して親和性を有するものであれば特に制限はない。好ましくは、2-アミノ-2-(2-フェニルエチル)プロパン-1,3-ジオール基または2-アミノ-2-(2-(炭素数2~8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル)エチル)プロパン-1,3-ジオール基に対して親和性を有する抗体である。

【0053】当該抗体としては、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体をともに包含する。また、当該抗体は、IgG、IgA、IgM、IgDまたはIgEのいずれの免疫グロブリンクラスに属するものであってもよいが、好ましくはIgGまたはIgMである。

【0054】本発明のポリクローナル抗体は、例えば以下の方法により作製することができる。上記の複合体と完全または不完全フロイントアジュバント(FCAまたはFIA)との混和物を感作抗原として、ウサギ、マウス、ラット、ヤギ、モルモットまたはハムスター等の哺乳動物に免疫(初回免疫から約1~4週間毎に1~数回追加免疫する)し、各追加免疫の約3~10日後に部分採血した血清の抗体価を従来公知の抗原抗体反応を利用して測定、その上昇を確認しておく。さらに、最終免疫から約3~10日後全血を採取して抗血清を精製する。ポリクローナル抗体は、硫酸分画等の塩析、遠心分離、透析、カラムクロマトグラフィー等の慣用の分離技術を用いて単独の免疫グロブリンクラスとして精製することもできる。

【0055】また、本発明のモノクローナル抗体は、通常細胞融合によって製造されるハイブリドーマ(融合細胞)から取得することができる。すなわち、上記ポリクローナル抗体の場合と同様、2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1,3-ジオール基含有化合物を担体に結合した複合体を免疫感作した哺乳動物から抗体産生細胞を単離し、これと骨髓腫細胞とを融合させてハイブリドーマを形成させ、当該ハイブリドーマをクローン化し、上記抗原あるいは2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1,3-ジオール基含有化合物をマーカー抗原(あるいはマーカーハプテン)として、それに対して特異的な親和性を示す抗体を生産するクローンを選択することによって製造される。また、あらかじめ単離された脾細胞あるいはリンパ球等に培養液中で

上記の複合体を作用させて生じる抗体産生細胞も使用することができる。この場合にはヒト由来の抗体産生細胞も調製可能である。

【0056】モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマの調製はケーラーおよびミルシュタインの方法 (Nature, Vol. 256, pp. 495-497, 1975) およびその変法に従って行うことができる。すなわち、本発明のモノクローナル抗体は、前述のごとく免疫感作された動物から取得される脾細胞、リンパ節細胞、末梢リンパ球、骨髓腫細胞あるいは扁桃細胞等、好ましくは脾細胞に含まれる抗体産生細胞と、好ましくは同種のマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物、より好ましくはマウス、ラットまたはヒトの骨髓腫細胞 (ミエローマ) との融合により得られるハイブリドーマを培養することにより調製される。培養は、インビトロまたはマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ等の哺乳動物、好ましくはマウスまたはラット、より好ましくはマウスの腹腔内等でのインビボで行うことができ、抗体はそれぞれ培養上清あるいは哺乳動物の腹水から取得することができる。

【0057】細胞融合に用いられる骨髓腫細胞としては、例えばマウス由来ミエローマ P3/X63-AG8, P3/NSI/1-Ag4-1, P3/X63-Ag8, U1, SP2/O-Ag14, F0あるいはBW5147、ラット由来ミエローマ 210RCY3-Ag1. 2. 3., ヒト由来ミエローマ U-266AR1, GML500-6TG-A1-2, UC729-6, CEM-AGR, D1R11あるいはCEM-T15等が挙げられる。

【0058】本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンのスクリーニングは、ハイブリドーマを例えばマイクロタイタープレート中で培養し、増殖のみられたウェル中の培養上清の、マーカー抗原 (またはハプテン) に対する反応性を、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ等によって測定することにより行うことができる。

【0059】モノクローナル抗体の単離精製は、上述のような方法によって製造される該抗体含有培養上清あるいは腹水を、イオン交換クロマトグラフィー、抗イムノグロブリンカラムまたはプロテインAカラム等のアフィニティーカラムクロマトグラフィーに付すことにより行うことができる。

【0060】本発明のモノクローナル抗体は、上述の製造方法に限定されることなく、いかなる方法で得られたものであってもよい。また、通常モノクローナル抗体は免疫感作を施す哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる構造の糖鎖を有するが、本発明におけるモノクローナル抗体は、該糖鎖の構造差異により限定されるものではなく、あらゆる哺乳動物由来のモノクローナル抗体をも包含するものである。さらに、例えばヒト免疫グロブリン

遺伝子を組み込まれたトランスジェニック動物から得られる組換えヒト型モノクローナル抗体、あるいはある哺乳動物由来のモノクローナル抗体の定常領域 (Fc) をヒト由来モノクローナル抗体のFc領域と組換えたキメラモノクローナル抗体、さらには抗原と相補的に直接結合し得る相補性決定部位 (CDR) 以外の全領域をヒト由来モノクローナル抗体の対応領域と組換えたキメラモノクローナル抗体も本発明のモノクローナル抗体に包含される。

【0061】本発明はまた、上記のようにして取得されるような、2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基に対して親和性を有する抗体、好ましくは2-アミノ-2- (2-フェニルエチル) プロパン-1, 3-ジオール基または2-アミノ-2- (2- (炭素数2~8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル) エチル) プロパン-1, 3-ジオール基に対して親和性を有する抗体を用いて、2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物、好ましくは2-アミノ-2- (2-フェニルエチル) プロパン-1, 3-ジオール基または2-アミノ-2- (2- (炭素数2~8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル) エチル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物を測定することを特徴とする、生体試料中の2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物、好ましくは2-アミノ-2- (2-フェニルエチル) プロパン-1, 3-ジオール基または2-アミノ-2- (2- (炭素数2~8個の直鎖状または分枝鎖状のアルキル置換フェニル) エチル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の測定方法を提供する。

【0062】測定対象の生体試料としては、例えば、ヒト、ラット、ヤギ、サル、イヌ、ブタなどの哺乳動物由来の血液、あるいはその血清、血漿等の体液または体液由来の試料が挙げられる。血清または血漿マトリックス効果により2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の回収率が低く良好な測定結果が得られない場合には、生体試料を水酸化ナトリウム水溶液等のアルカリ存在下にクロロホルム抽出することにより、目的物質を抽出・濃縮することができる。

【0063】用いられる抗体はポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のいずれであってもよいが、より選択性が高く、各製造ロット間でその特性に差がない等の理由からモノクローナル抗体がより好ましい。また、完全な抗体分子だけでなく、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、H鎖、L鎖、可変領域、超可変領域、CDR等の、抗原またはハプテンとの結合能を有する断片もまた、好ましく使用することができる。

【0064】本発明の測定方法は、高感度を実現するために、酵素、蛍光物質 (例えば、フルオレセインイソチ

オシアネート、アクリジン、ローダミン等) または放射性同位元素 (R I) を標識として利用する。特別な実験施設や装置を必要としない等の点で、酵素標識が特に好ましく使用できる。用いられる酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素もしくはウレアーゼ等が挙げられるが、好ましくはペルオキシダーゼ、特に西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ (以下、H R P と称する場合もある) である。標識される物質は、測定に用いる抗原抗体反応の様式に応じて2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物、抗2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基抗体あるいは該抗体に対して特異的な親和性を有する二次抗体のうちから選択されるが、いずれの場合でも、常法に従って直接または架橋剤を介して間接的に標識することができる。

【0065】本発明の測定方法の好ましい一態様においては、固相化された上記抗2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基抗体、好ましくはモノクローナル抗体に、生体試料と、標識、好ましくは酵素標識された2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物とを競合的に反応させた後、固相と液相とを分離し、その一方に存在する標識量を測定することにより、生体試料中の2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物を測定する (本法を以下、直接法1という)。用いられる固相としては、例えばプレート (イムノプレート等)、粒子 (イムノビーズ等)、ポリスチレンボールや試験管等が使用されるが、簡便な操作性の点でイムノプレートが好ましい。固相に結合した酵素標識物質または液相中の酵素標識物質の検出は、標識に使用される酵素の活性を、常法により測定することにより行われる。例えば、標識に用いられた酵素がH R P の場合には、o-フェニレンジアミンと過酸化水素水とを含む酵素基質溶液を使用し、酸化された基質の発色の程度を吸光度測定することにより2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の定量が行われる。本法により、2-アミノ-2- (2-フェニルエチル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の微量濃度 ( $10^{-1} \sim 10^2$  ng/ml) を高感度かつ簡便に定量的および定性的に測定することができる。なお、本発明においては、検出限界を、ラットブランク血清8例についての測定値の標準偏差の2倍以上の特異シグナルを与える標準血清中のF T Y 7 2 0 濃度として定義する。また、検量線が直線性を示す上限を定量可能上限とする。

【0066】本発明の測定方法の別の好ましい一態様においては、上記抗2-アミノ-2- (アリールアルキ

ル) プロパン-1, 3-ジオール基抗体、好ましくはモノクローナル抗体に、生体試料と、標識、好ましくは酵素標識された2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物とを競合的に反応させ、該反応液を、該抗体に対して親和性を有する固相化された二次抗体とさらに反応させた後、固相と液相とを分離し、その一方に存在する標識量を測定することにより、生体試料中の2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物を測定する (本法を以下、間接法1という)。二次抗体としては、抗2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基抗体もしくは該抗体と同一の抗原決定基を有する抗体を抗原として用いて常法により調製される抗体でも、あるいは市販されている抗体でもよいが、一次抗体と検出すべき物質との抗原抗体反応を妨げず、且つ一次抗体を特異的に認識するものであればポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず使用できる。例えば、ウサギ由来I g G クラス抗体を一次抗体として使用する場合は、二次抗体としてヤギ抗ウサギI g G が、また、マウス由来I g G クラス抗体を一次抗体として使用する場合は、二次抗体としてウサギ抗マウスI g G が好ましく使用できる。用いられる固相や標識酵素および該酵素の検出方法は、上記の測定法の場合と同様である。本法により、2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の微量濃度 ( $10^1 \sim 10^3$  ng/ml) を高感度且つ簡便に定量的および定性的に測定することができる。

【0067】本発明の別の態様においては、生体試料と、標識、好ましくは酵素標識された上記抗2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基抗体、好ましくはモノクローナル抗体とを反応させ、該反応液を、固相化された2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物とさらに反応させた後、固相と液相とを分離し、その一方に存在する標識量を測定することにより、生体試料中の2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物を測定する (本法を以下、直接法2という)。F T Y 7 2 0 やA M P D 物質のような低分子化合物は、単独で固相に吸着させることが困難であるが、適当なキャリアー (例えばアルブミン等のタンパク質や多糖体など) と結合させることにより、常法を用いて固相に吸着させることが可能となる。なお、用いられる固相や標識酵素および該酵素の検出方法は、上記の測定法の場合と同様である。本法により、2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の微量濃度 ( $10^1 \sim 10^4$  pg/ml) を高感度且つ簡便に定量的および定性的に測定することができる。

【0068】本発明のさらに別の態様においては、生体試料と、抗2-アミノ-2- (アリールアルキル) プロ

パン-1, 3-ジオール基抗体、好ましくはモノクローナル抗体とを反応させ、該反応液を、固相化された2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物とさらに反応させた後、固相と液相とを分離し、該固相に該抗体に対して親和性を有する標識(好ましくは酵素標識)された二次抗体を反応させ、液相を除去した後、該固相中の標識量を測定することにより、生体試料中の2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物を測定する(本法を以下、間接法2という)。2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物の固相化方法、用いられる固相、二次抗体、並びに標識酵素および該酵素の検出方法は、上記の測定法の場合と同様である。

【0069】本発明はまた、上記の各測定方法を簡便に行うための2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物測定用キットを提供する。例えば、上記直接法1を実施する場合には、該キットは、少なくとも、抗2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基抗体、好ましくはモノクローナル抗体、および標識、好ましくは酵素標識された2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物を含む。また、間接法1にて測定する場合には、該キットはさらに上記抗体に対して親和性を有する二次抗体を含む。

【0070】また、上記直接法2の場合、本発明のキットは、標識、好ましくは酵素標識された抗2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基抗体、好ましくはモノクローナル抗体、および固相化可能な2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物を含む。固相化可能な2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物としては、例えば、アルブミン等の適当なキャリアーに結合されたFTY720またはAMPD物質などが挙げられる。

【0071】さらにまた、上記間接法2の場合、本発明のキットは、抗2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基抗体、好ましくはモノクローナル抗体、該抗体に対して親和性を有する標識(好ましくは酵素標識)された二次抗体、および固相化可能な2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物を含む。

【0072】また、本発明のキットは、2-アミノ-2-(アリアルアルキル)プロパン-1, 3-ジオール基含有化合物を定量的に測定する場合に必要な既知量の同化合物を標準試料として含むことが望ましい。さらに、該キットは、本発明の高感度免疫測定法を実施する際に使用される周知の試薬類(例えば、反応緩衝液、ブロッキング液、洗浄液、標識検出試薬等)および器具類(例えば、反応容器等)を含んでいてもよい。

### 【0073】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、これらは単なる例示であって本発明を何ら限定するものではない。

【0074】実施例1 AMPDの合成(全工程を図1に示す)

(1) 4-フェニル酪酸 [1] (19.0g,  $1.16 \times 10^{-1}$  mol) の無水エタノール (300ml) 溶液に p-トルエンスルホン酸 (1.10g,  $5.79 \times 10^{-3}$  mol) を加えて2時間還流した。反応液を減圧乾固し、氷水 (50ml) を加えて酢酸エチル (200ml) で抽出した。該抽出液を飽和炭酸水素ナトリウム水 (20ml)、飽和食塩水 (5ml × 2回) で順次洗浄し乾燥した後、溶媒を留去して淡黄色油状物質 [2] (21.6g, 97%) を得た。

(2) 油状物質 [2] (20.0g,  $1.04 \times 10^{-1}$  mol) の無水クロロホルム (250ml) 溶液にプロモアセチルクロリド (10.4ml,  $1.26 \times 10^{-1}$  mol) を加え、 $-10^{\circ}\text{C}$  で塩化アルミニウム (30.6g,  $2.29 \times 10^{-1}$  mol) を少量ずつ添加し、15分間攪拌後、室温でさらに1.5時間攪拌した。該反応液を氷中 (200ml) にゆっくりと注加し、クロロホルム (100ml) を加えて室温で15分間攪拌した。クロロホルム層を分取し、飽和炭酸水素ナトリウム水 (200ml)、飽和食塩水 (50ml) で順次洗浄し、乾燥した。溶媒を留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-酢酸エチル (9:1) 溶出部より無色油状物質 [3] (28.8g, 88%) を得た。

(3) 氷冷下、油状物質 [3] (7.9g,  $2.5 \times 10^{-2}$  mol) のトリフルオロ酢酸 (25ml) 溶液に、トリエチルシラン (8.9ml,  $5.6 \times 10^{-2}$  mol) を加えて15分間攪拌後、室温でさらに4時間攪拌した。該反応液を氷水中 (150ml) に注加し、酢酸エチル (200ml) および炭酸水素ナトリウム粉末 (27g) を加えた。酢酸エチル層を分取し、飽和炭酸水素ナトリウム水 (20ml)、飽和食塩水 (15ml × 2回) で順次洗浄し、乾燥した。溶媒を留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-酢酸エチル (40:1) 溶出部より無色油状物質 [4] (5.1g, 68%) を得た。

(4) 油状物質 [4] (4.8g,  $1.6 \times 10^{-2}$  mol) の2-ブタノン (100ml) 溶液にヨウ化ナトリウム (7.9g,  $5.3 \times 10^{-2}$  mol) を加えて4時間還流した。反応液を減圧乾固し、氷水 (20ml) を加えて酢酸エチル (50ml) で抽出した。該抽出液を飽和亜硫酸ナトリウム水 (80ml および 20ml)、飽和食塩水 (20ml × 2回) で順次洗浄し乾燥した後、溶媒を留去して淡黄色油状物質 [5] (5.4g, 97%) を得た。

(5) アルゴン気流下、ジエチルアセトアミドマロネート (15 g,  $6.9 \times 10^{-2}$  mol) の無水DMF (46 ml) 溶液に、60%水素化ナトリウム (2.0 g,  $5.0 \times 10^{-2}$  mol) を加えて90℃で油浴加熱した。該溶液に無水テトラヒドロフラン (60 ml) を加え、次いで、油状物質 [5] (8.0 g,  $2.3 \times 10^{-2}$  mol) の無水テトラヒドロフラン (6 ml) 溶液を加えて2時間還流した。該反応液を減圧乾固し、氷水 (50 ml) を加えてジエチルエーテル (150 ml) で抽出した。該抽出液を飽和食塩水 (20 ml  $\times$  2回) で洗浄し、乾燥した。溶媒を留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-酢酸エチル (3:1) 溶出部より無色油状物質 [6] (8.6 g, 85%) を得た。

(6) 氷冷下、[6] (1.9 g,  $4.4 \times 10^{-3}$  mol) のエタノール (7 ml) 溶液に水素化ホウ素ナトリウム (0.80 g,  $2.1 \times 10^{-2}$  mol) を加え、室温で7時間攪拌した。該反応液に氷水 (10 ml) および酢酸エチル (50 ml) を加え、1N塩酸でpH3とした後、酢酸エチル層を分取し、飽和食塩水 (10 ml) で洗浄し、乾燥した。溶媒を留去して得られた残渣に、2,2-ジメトキシプロパン (9.0 ml,  $7.3 \times 10^{-2}$  mol) およびp-トルエンスルホン酸 (82 mg,  $4.3 \times 10^{-4}$  mol) を加え、室温で18時間攪拌した。反応液を減圧乾固し、氷水 (10 ml) を加えて酢酸エチル (30 ml) で抽出した。該抽出液を飽和食塩水 (5 ml) で洗浄し、乾燥した。溶媒を留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-酢酸エチル (2:1  $\rightarrow$  1:1) 溶出部より無色結晶 [7] (0.84 g, 49%) を得、ヘキサン-酢酸エチル (1:2) 溶出部より無色結晶 [8] (0.23 g, 15%) を得た。

(7) 氷冷下、[7] (1.3 g,  $3.3 \times 10^{-3}$  mol) の無水ジエチルエーテル (80 ml) 溶液に水素化リチウムアルミニウム (0.38 g,  $1.0 \times 10^{-2}$  mol) を加え、室温で2時間攪拌した。氷冷下、反応液に飽和酒石酸ナトリウムカリウム水 (ロッセル塩) を加え、上澄液を分取した。溶媒を留去して、得られた残渣をベンゼンにより再結晶化させ、無色針状結晶 [8]

元素分析 (計算値)  $C_{15}H_{26}NO_2$  SC1: C: 56.32, H: 8.19, N: 4.38  
(実験値) C: 56.37, H: 8.09, N: 4.49

(11) アルゴン気流下、[10] (0.047 g,  $1.2 \times 10^{-4}$  mol) のメタノール (1.0 ml) 溶液に5N水酸化ナトリウム (0.025 ml) を加えて室温で0.5時間攪拌した。氷冷下、該反応液に1N塩酸を加えてpH3とした後、析出した沈殿を濾取し、無色板状結晶 [11] (0.023 g, 55%) を得た。

(12) アルゴン気流下、[11] (5.7 mg,  $1.6 \times 10^{-5}$  mol) のエタノール (1.0 ml) 溶液に10%塩

(0.78 g, 67%) を得た。

(8) 氷冷下、[8] (0.45 g,  $1.3 \times 10^{-3}$  mol) の無水ジクロロメタン (5.0 ml) - トリエチルアミン (0.36 ml,  $2.6 \times 10^{-3}$  mol) 溶液にp-トルエンスルホンクロリド (0.30 g,  $1.6 \times 10^{-3}$  mol) を加え、室温で13時間攪拌した。反応液を減圧乾固し、氷水 (5 ml) を加えて、酢酸エチル (20 ml) で抽出した。該抽出液を飽和食塩水 (1 ml) で洗浄し、乾燥した後、溶媒を留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-酢酸エチル (1:3) 溶出部より無色結晶 [9] (0.49 g, 75%) を得た。

(9) アルゴン気流下、[9] (0.45 g,  $8.9 \times 10^{-4}$  mol) の無水エタノール (10 ml) 溶液に90%チオ酢酸カリウム (0.13 g,  $1.0 \times 10^{-3}$  mol) を加え、1時間還流した。反応液を減圧濃縮後、氷水 (5 ml) を加えて酢酸エチル (20 ml) で抽出した。該抽出液を飽和食塩水 (1 ml) で洗浄し、乾燥した後、溶媒を留去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-酢酸エチル (1:1) 溶出部より無色結晶 [10] (0.29 g, 80%) を得た。

(10) アルゴン気流下、[10] (0.077 g,  $1.9 \times 10^{-4}$  mol) のエタノール (2.0 ml) 溶液に10%塩酸 (1.5 ml) を加えて8時間還流した。反応液を減圧留去して白色粉末 (0.060 g, 100%) を得た。ジエチルエーテル-メタノールより再結晶し、無色板状結晶 [12] を得た。

無色板状結晶 [12]:

融点: 105~113℃ (分解);

IR  $\nu_{max}$  (CHCl<sub>3</sub>)  $cm^{-1}$ : 3550-3150, 3150-2400;

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.53 (2H, m), 1.62 (2H, m), 1.76 (2H, m), 2.23. (1H, t, J=8.0Hz), 2.46-2.55 (4H, m), 2.59 (2H, m), 3.52 (each 2H, d, J=5.0Hz), 5.36 (2H, t, J=5.0Hz), 7.11 (4H, br s), 7.82 (3H, br s);

FAB-MS (-) m/z: 318, 320 (M-1)

+

酸 (0.60 ml) を加えて0.5時間還流した。反応液を減圧留去して白色粉末 (4.9 mg, 98%) を得た。該物質の<sup>1</sup>H-NMRデータは上記の工程(10)で得られた無色板状結晶 [12] のそれと完全に一致した。

【0075】実施例2

化合物 [6] は、次のようにして化合物 [4] から直接合成することができる。アルゴン気流下、ジエチルアセトアミドマロネート (4.8 g,  $2.2 \times 10^{-2}$  mol)

1) の無水DMF (10ml) 溶液に、60%水素化ナトリウム (0.74g,  $1.9 \times 10^{-2}$  mol) を加えて90℃で油浴加熱した。該溶液に無水テトラヒドロフラン (10ml) を加え、次いで、油状物質 [4]

(2. 2g,  $7.4 \times 10^{-3}$  mol) の無水テトラヒドロフラン (5ml) 溶液を加えて4. 5時間還流した。該反応液を減圧乾固し、氷水 (20ml) を加えてジエチルエーテル (80ml) で抽出した。該抽出液は飽和食塩水 (5ml  $\times$  2回) で洗浄し、乾燥した。溶媒を除去して得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-酢酸エチル (2: 1) 溶出部より無色油状物質 [6] (2. 6g, 81%) を得た。

【0076】実施例3 AMPD-卵白アルブミン (OVA) 複合体の調製

(1) マレイミド化卵白アルブミンの調製

10mg/ml 卵白アルブミン (OVA) を含む0. 1Mリン酸緩衝液 (pH7. 0) 0. 6mlに80mM N-(6-マレイミドカプロイルオキシ) サクシンイミド/N, N-ジメチルホルムアミド0. 06mlを加え、30℃で30分間保温した後、緩衝液D (5mM EDTAを含む0. 1Mリン酸ナトリウム緩衝液, pH6. 0) で平衡化したセファデックスG-50 (商品名) カラム (1 $\times$ 5cm) を用いて、遠心 (100 $\times$ g, 2分間) によりゲル濾過を行い、マレイミド化OVAを得た。OVAの280nmにおける吸光係数 $E_{280} = 0.74 \text{ g}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  から算出したマレイミド化OVA濃度は $1.38 \times 10^{-4} \text{ M}$ であった。導入されたマレイミド基数はOVA1分子あたり平均8. 4分子であった。

(2) AMPD-OVA複合体の調製

実施例1で得られたAMPD1. 2mgを緩衝液D3mlに溶解後、ミリポアフィルターで濾過した。4. 4-ジチオジピリジンの還元を指標としてチオール基を定量し、該チオール基濃度 (0. 45mM) をAMPD濃度とした。このAMPD溶液1. 48ml ( $667 \text{ nmol}$ ) を、上記 (1) で得られたマレイミド化OVA溶液0. 484ml ( $66.7 \text{ nmol}$ ) に加え、4℃で20時間保温した後、緩衝液Dに溶解した0. 1M 2-メルカプトエチルアミン塩酸塩18. 64 $\mu$ lを加え、30℃で15分間保温した。次いで、緩衝液A (0. 1mM NaClを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液, pH7. 0) で平衡化したセファデックスG-25カラム (1 $\times$ 30cm) を用いて、ゲル濾過を行い、AMPD-OVA複合体を得た。マレイミド基の減少から算出された結合AMPD分子数は、OVA1分子あたり平均6. 8分子であった。卵白アルブミンの280nmにおける吸光度から算出されたAMPD-OVA複合体濃度は0. 414mg/mlであった。

【0077】実施例4 抗AMPDポリクローナル抗体の調製

(1) 抗血清の取得

完全フロイントアジュバント (FCA) 1. 2mlを5mlのガラス注射筒に注入した後、実施例3で得られたAMPD-OVA複合体1. 2mlを該注射筒に注入して乳化させた。これをテルモシリンジ注射針付ツベルクリン用注射筒 (SS-01T2613S) に0. 5mlずつ分注した。雌性ウサギ (日本白色種、体重2. 7~2. 8kg) 3羽に、上記のように調製した乳化したAMPD-OVA複合体をそれぞれ100 $\mu$ g皮内投与した。3週間間隔で、乳化したAMPD-OVA複合体100 $\mu$ gを2回皮内投与して追加免疫を行った。最終免疫の1週間後にネンブタール麻酔下、頸動脈より全血を採取した。得られた血液を室温で2. 5時間保温後、2000 $\times$ g (4000rpm) で10分間遠心して抗血清を得た。

(2) IgG画分、F(ab')<sub>2</sub> およびFab' の調製

室温で攪拌しながら、上記 (1) で得られた各血清10mlにそれぞれ硫酸ナトリウム (1. 8g) を少量ずつ添加し、溶解後さらに30分間攪拌した後、室温、5500 $\times$ g (7000rpm) で15分間遠心分離した。沈殿を17. 5mMリン酸緩衝液 (pH6. 3) 5mlに溶解させ、同緩衝液1Lに対して4℃で5時間透析した後、透析外液を交換してさらに一夜透析した。上清を17. 5mMリン酸緩衝液 (pH6. 3) で平衡化したDE52-セルロースカラム (1. 5 $\times$ 7cm) のクロマトグラフィーに付し、IgG画分 (ウサギ1IgG, ウサギ2IgGおよびウサギ3IgG) を得た。各ウサギの最終体重、血清量、IgG濃度を表1に示す。得られた3種の抗AMPDウサギIgG5mgを0. 1M塩化ナトリウムを含む0. 1M 酢酸ナトリウム (pH4. 5) 300mlで一夜透析した後、280nmにおける吸光度を測定してIgG濃度を算出した。透析内液にIgGの1/50量の1mg/mlペプシン溶液を加え、37℃で15時間保温した後、緩衝液Dで平衡化したUltrogel AcA44 (商品名) カラム (1. 5 $\times$ 45cm) によるゲル濾過を行い、F(ab')<sub>2</sub> を得た。各ウサギ由来のF(ab')<sub>2</sub> 濃度を表1に示す。各F(ab')<sub>2</sub> 溶液をCentricon-30 (商品名) を用いて4℃、4000 $\times$  (6000rpm) で10分間遠心し、濃縮した。該濃縮液0. 60mlに緩衝液Dに溶解した2-メルカプトエチルアミン塩酸塩66. 7 $\mu$ lを加え、37℃で1. 5時間保温した後、緩衝液Dで平衡化したセファデックスG-50カラム (1 $\times$ 5cm) を用いて遠心 (100 $\times$ g, 2分間) によるゲル濾過を行い、Fab' を得た。各ウサギ由来のFab' 濃度、Fab' のチオール基濃度およびFab' 1分子あたりのチオール基数を表1に示す。

【0078】

【表1】



25

26

ウサギ	ウサギ1	ウサギ2	ウサギ3
最終体重 (kg)	3.58	3.20	3.40
血清量 (ml)	51.2	55.3	47.0
IgG濃度 (mg/ml)	2.64	2.16	2.96
F(ab) <sub>2</sub> 濃度 (mg/ml)	0.275	0.313	0.354
Fab濃度 (μM)	62.6	60.9	70.0
SH基濃度 (μM)	68.9	50.1	75.1
SH基数/Fab分子	1.10	0.82	1.07

## 【0079】実施例5 ハプテン基の解析

実施例4で得られたウサギ2由来抗AMPDIgGが認識するハプテン基の解析を、競合法によるEIAを用いて行った。すなわち、該IgGを固相化した後、FTY720またはその類似体とHRP標識AMPDとを競合的に反応させ、*o*-フェニレンジアミンを水素供与体として固相に結合したHRP活性を測定し、各化合物につ

いて比較した。その結果を表2に示す（各化合物に対する交叉反応性は、FTY720の固相への結合度を100としたときの各化合物の相対結合度として示している）。なお、EIAの詳細については後記実施例7にて説明する）。

## 【0080】

【表2】

化合物		相対活性(%)
A.		
FTY720		100
[13]		0.6
[14]		n.d.
[15]		0.5
[16]		14
B.		
[17]		4.7
[18]		n.d.
[19]		n.d.
C.		
[20]		5.9
[21]		0.4

n.d.:検出されず

【0081】FTY720のジオール部をモノオールに変換した化合物[13]、ジオール部をすべてアセチル化した化合物[14]およびアミノ基をアセチル化およびジメチル化した化合物[15]および[16]に対しては、該抗体（Fab'）はほとんどあるいは全く交叉反応性を示さなかった（表2. A）。また、ベンゼン環を有しない化合物[17]～[19]に対しても該抗体はほとんどあるいは全く交叉反応性を示さなかった（表2. B）。さらに、該抗体

は2-アミノプロパン-1, 3-ジオール部とベンゼン環の間の炭素数も認識し、2-アミノ-2-(2-フェニルエチル)プロパン-1, 3-ジオール基に対して特に高い親和性を示すことが明らかとなった（表2. C）。

## 【0082】実施例6 抗AMPDモノクローナル抗体の調製

## (1) 脾細胞およびミエローマ細胞の調製



実施例4で調製した乳化AMPD-OVA複合体100  $\mu$ gを雌性BALB/cマウス(8週齢)に腹腔内注射する。初回免疫から2週間毎に、等量の不完全フロイントアジュバント(FIA)で乳化したAMPD-OVA 100  $\mu$ gを2回腹腔内注射して追加免疫を行う。2週間後、10倍量のFIA乳化AMPD-OVA複合体(1mg)を皮内投与し、さらに最終免疫としてFIA乳化AMPD-OVA複合体200  $\mu$ gを尾静脈より静注し、その3日後にマウスを安楽死させて開腹し、脾臓を摘出する。脾臓をピンセットでほぐして脾細胞を無血清のダルベッコ氏改変イーグルズ最少必須培地(D-MEM: GIBCO社製)に懸濁する。脾細胞浮遊液中の赤血球を、0.83%塩化アンモニウム溶液(9容量)と0.17M トリス塩酸緩衝液(pH7.65, 1容量)との混液で5分間処理して破壊し、遠心分離により除去する。ミエローマ細胞として市販のマウスミエローマ細胞P3 $\times$ 63AgBU $\cdot$ 1(大日本製薬)を一旦増殖させた後液体窒素中で凍結保存し、これを融解後さらに増殖させて細胞融合に供する。該細胞の培養には10%ウシ胎仔血清(FBS)含有D-MEMを用いる。上記のように調製した脾細胞およびミエローマ細胞浮遊液は、D-MEMで数回洗浄した後細胞融合に供する。

#### (2) 細胞融合およびハイブリドーマの選択

ミエローマ細胞(4 $\times$ 10<sup>7</sup>個)浮遊液に脾細胞(2 $\times$ 10<sup>8</sup>個)浮遊液を加え、該混液を50mlプラスチック管(コニング・グラス・ワークス社製50mlコニング遠心管)中でよく混合する。培地を遠心分離により除去し、細胞を水浴中で37℃に加温する。この細胞に、45%ポリエチレングリコール(平均分子量4,000;メルク社製)溶液1mlを振り混ぜながら1分間かけて徐々に加え、混合物を室温で5分間放置する。反応混合物に5分間かけてD-MEM15mlを滴加して細胞融合反応を停止させ、大量のD-MEMを加えた後混合物を遠心分離して上清を除去する。残渣に15%FBS(センタウラス社製、Lot757)、2mMグルタミン、2 $\times$ 10<sup>-5</sup>M 2-メルカプトエタノール、100  $\mu$ g/ml硫酸ストレプトマイシン、100U/mlペニシリンG、80  $\mu$ g/ml硫酸ゲンタマイシンおよびファンギゾン(アンホテリシンB;GIBCO社製)を補ったD-MEMよりなる完全培地(以下、CMという)を加える。混合物を少し混ぜた後、生じた融合細胞浮遊液を、24ウェルのプレート(ヌンク社製)10枚に、脾細胞が1ウェルあたり1 $\times$ 10<sup>6</sup>個となるように1ウェルに1mlずつ分注し、5%炭酸ガス気中、37℃で1日培養した後、アミノプテリン(4 $\times$ 10<sup>-7</sup>M)、チミジン(1.6 $\times$ 10<sup>-5</sup>M)およびヒポキサンチン(1 $\times$ 10<sup>-4</sup>M)を含有するCM(HAT培地)1mlを各ウェルに添加する。1日後、各ウェルから半量の培地を吸引除去し、新鮮なHAT培地を添加する。その後2日または3日毎に同様の培地交換を続ける。

#### (3) 抗AMPD抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニング

上記選択培地での培養により生育したハイブリドーマコロニーについてELISA法にて所望の抗体産生の有無を調べる。すなわち、実施例3において、OVAの代わりにウシ血清アルブミン(BSA)をキャリアタンパク質として用い、同様にして調製されたAMPD-BSA複合体(20  $\mu$ g/ml緩衝液A)を96ウェルのプレートに10  $\mu$ lずつ添加して37℃で2時間静置し、固相に吸着させる。該プレートの各ウェルに各ハイブリドーマコロニーの培養上清を30  $\mu$ lずつ添加して37℃で2時間静置する。反応液を吸引除去し、1%BSA含有PBSで洗浄後、HRP標識抗マウスIgA+IgG+IgM(H+L鎖)抗体(カッペル社製)の2000倍希釈液を加え、37℃で1時間放置する。反応液を吸引除去し、1%BSA含有PBSで洗浄後、常法の発色反応によりHRP活性を測定して陽性細胞群を得る。AMPD物質およびFTY720に対して特異的であるかどうかは、上記のAMPD-BSAをコーティングしたプレートにAMPDまたはFTY720溶液(1%BSA含有PBS1ml中100  $\mu$ g)を各ウェル10  $\mu$ lずつ添加し、さらに上記陽性細胞の培養上清30  $\mu$ lを加えて上記と同様の反応を行い、固相に結合したHRP活性の減少を指標にして判定する。AMPDおよびFTY720の両方と反応する抗体は、両化合物に共通する2-アミノ-2-(2-フェニルエチル)プロパン-1,3-ジオール基のある部位をハプテン基として認識することが示唆される。該抗体を産生するハイブリドーマのうち特に抗体価の高いウェルの細胞について、BALB/cマウスの胸膜細胞をフィーダー層(5 $\times$ 10<sup>6</sup>細胞/ml)として用いた96ウェル平底マイクロプレート(ヌンク社製)を用いて限界希釈法によりクローニング操作を行い、AMPDおよびFTY720と特異的に反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマクローンを得る。

#### (4) 抗体クラスの特定

上記(3)で得られるハイブリドーマクローンが産生する抗体クラスを、Mouse monoAb ID/SP Kit(Zymed社製)を用いて以下のように調べる。各クローンをそれぞれ10%FBS含有CM中で、5%炭酸ガス気中、37℃の条件で培養する。得られた培養上清を6群に分け、それぞれにIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2a</sub>、IgG<sub>2b</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgAまたはIgMに対する抗体のいずれか1つを添加して492nmでの吸光度を測定し、標準ウサギ血清の吸光度に対する各群の吸光度の比が5以上のものを陽性と判定する(ネガティブコントロールとして、マウスミエローマP3 $\times$ 63AgBU $\cdot$ 1を用いる)。

#### (5) 抗体の単離精製

2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカンを投与して免疫抑制状態にした雌性BALB/cマウスの腹腔

内にハイブリドーマを1マウスあたり $1 \times 10^7$ 個移植し、10～14日後に腹水を採取する。該腹水を50%飽和硫酸で分画した後、10mMリン酸緩衝液(pH 8.0)に対して透析し、10mMリン酸緩衝液(pH 8.0)で平衡化したDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーに付し、10mMリン酸緩衝液(pH 8.0)中、NaClの連続濃度勾配法で溶出させ、モノクローナル抗体のイムノグロブリンクラス画分を回収する。

【0083】実施例7 FTY720のエンザイムイムノアッセイ(直接法1)

#### (1) HRP標識AMPDの調製

10mg/ml HRPを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0) 1.78mlに30mM N-(6-マレイミドカプロイルオキシ)サクシンイミド/N,N-ジメチルホルムアミド0.178mlを加え、30℃で1時間保温した後、緩衝液Dで平衡化したセファデックスG-25カラム(1×30cm)によるゲル濾過を行い、マレイミド化HRPを得た。HRPの403nmにおける吸光係数 $E_{403} = 2.275 \text{ g}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ から算出されたマレイミド化HRP濃度は $134 \mu\text{M}$ であった。導入されたマレイミド基数は、HRP 1分子あたり平均0.93分子であった。このマレイミド化HRP 0.566ml(200nmol)に、3.51mM AMPD水溶液0.147ml(516nmol)を加え、室温で1時間保温した後、反応液0.553mlに緩衝液D 0.394mlを混和し、該混液0.6mlを緩衝液Dで平衡化したセファデックスG-50カラム(1×5cm)を用いた遠心(100×g, 2分間)によるゲル濾過に付して過剰量のAMPDを除去した。次いで、濾液0.784mlに緩衝液Dに溶解した0.1M 2-メルカプトエチルアミン塩酸塩7.84μlを加え、室温で15分間保温した後、緩衝液A 500mlに対して2日間透析し、HRP標識AMPDを得た(1.61mg/ml)。マレイミド基の減少から算出した結合AMPD分子数はHRP 1分子あたり平均1.0分子であった。

#### (2) 固相化ウサギ抗AMPDIgGポリクローナル抗体の調製

実施例4の(2)で調製したウサギ2由来抗AMPDIgGのPBS溶液をELISA用プレートS(MS-3496F;住友ベークライト社製)に分注し、4℃で一夜静置して固相化した。溶液を吸引除去した後プレートをPBSで3回洗浄した。

#### (3) 抗原抗体反応

上記のプレートに1%BSA含有PBSを満たして37℃で30分間放置してブロッキングを行った後、該溶液を除去した。該プレートの各ウェルに、1%BSA含有PBSで系列希釈した標準FTY720溶液および上記

(1)で調製したHRP標識AMPDを1%BSA含有

PBSで $2 \times 10^5$ 倍希釈した液を各100μlずつ添加して、プレートミキサーで10秒間攪拌した後4℃で一夜放置した。

#### (4) HRP活性測定

反応液を吸引除去し、0.05% Tween 20(商品名)含有PBSで各ウェルを2回洗浄した後、酵素基質溶液[o-フェニレンジアミンと30%過酸化水素水をMcIlvaine緩衝液(0.1Mリン酸水素二ナトリウム, 0.1Mクエン酸, pH 5.4)に溶解したもの]を分注し、30分間室温で反応させた(酵素基質溶液は使用直前に調製した)。4N硫酸50μlを添加して反応を停止させ、酵素基質溶液を対照として、マルチスキャン(商品名:タイターテック社製)により492nmにおける反応液の吸光度を測定した。得られた吸光度の数値をFTY720濃度に対してプロットした結果、検量線が直線性を示した上限(定量可能上限)は45ng/mlであった。また、ラットブランク血清8例を本測定法で測定した時の標準偏差の2倍以上の特異シグナルを与える標準血清中のFTY720濃度(検出限界)は0.45ng/mlであった。

【0084】実施例8 FTY720物質のエンザイムイムノアッセイ(間接法1)

17.2mg/mlヤギ(抗ウサギIgG)IgG抗体(29.07μl)に0.1%アジ化ナトリウムを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.5) 5mlを加え、0.1mg/mlとした。該溶液にポリスチレンビーズ(約300個)を入れ、4℃で一夜保温した。保温後、IgG溶液を吸引により除去し、緩衝液C(0.1%BSA, 1mM塩化マグネシウム, 0.1%アジ化ナトリウムを含む緩衝液A)にて10回洗浄後、緩衝液C中で4℃にて一夜保温した。0.2%ウサギ2由来抗AMPDIgGのBSA含有PBS溶液と標準FTY720溶液(0.1, 10ng/ml)を、試験管に50μlずつ加え、4℃で4時間保温した後、実施例7の(1)で調製したHRP標識AMPD 50μlを加えて4℃で一夜保温した。この溶液に、上記のように調製したヤギ(抗ウサギIgG)IgG不溶化ポリスチレンビーズ(3個)を加え、20℃で3時間保温した後、溶液を除去し、ビーズを緩衝液Aで洗浄した。該ビーズ(3個)に結合したHRP活性を実施例7の(4)と同様に測定した。その結果、本アッセイ系の定量可能範囲は10～1000ng/mlであった。

【0085】実施例9 FTY720物質のエンザイムイムノアッセイ(直接法2)

#### (1) HRP標識抗AMPDIgGポリクローナル抗体Fab'の調製

実施例7の(1)と同様にしてマレイミド化HRPを調製した。HRPの403nmにおける吸光係数 $E_{403} = 2.275 \text{ g}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ から算出されたマレイミド化HRP濃度は $82.5 \mu\text{M}$ であった。導入されたマレイ

ミド基数は、HRP 1 分子あたり平均 1.85 分子であった。実施例 4 の (2) で調製した各ウサギ抗 AMPD IgG ポリクローナル抗体の Fab' (ウサギ 1 = 0.55 ml, ウサギ 2 = 0.54 ml, ウサギ 3 = 0.56 ml) に、上記のマレイミド化 HRP (ウサギ 1 = 0.417 ml, ウサギ 2 = 0.398 ml, ウサギ 3 = 0.472 ml) を加えて攪拌した後、Centricon-30 (商品名) を用いて 4℃、4000×g (6000 rpm) で 10 分間遠心して濃縮した。濃縮液を 4℃で一夜保温した後、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化した Ultrogel AcA44 (商品名) カラム (1.5×45 cm) によるゲル濾過を行い、HRP 標識 Fab' 画分を得た。

#### (2) AMPD-BSA 複合体の調製

10 mg/ml BSA を含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 0.6 ml に 30 mM N-(6-マレイミドカプロイルオキシ) サクシンイミド/N,N-ジメチルホルムアミド 0.06 ml を加え、30℃で 30 分間保温した後、緩衝液 D で平衡化したセファデックス G-50 カラム (1×5 cm) を用いて、遠心 (100×g, 2 分間) によりゲル濾過を行い、マレイミド化 BSA を得た。BSA の 280 nm における吸光係数  $E_{280} = 0.63 \text{ g}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  から算出したマレイミド化 BSA 濃度は  $1.01 \times 10^{-4} \text{ M}$  であった。導入されたマレイミド基数は BSA 1 分子あたり平均 10.1 分子であった。一方、実施例 1 で得られた AMPD 1.2 mg を緩衝液 D 3 ml に溶解後、ミリポアフィルターで濾過して 0.45 mM AMPD 溶液を調製した。この AMPD 溶液 1.01 ml (455 nmol) を、マレイミド化 BSA 溶液 0.450 ml (45.3 nmol) に加え、4℃で 20 時間保温した後、緩衝液 D に溶解した 0.1 M 2-メルカプトエチルアミン塩酸塩 14.60 μl を加え、30℃で 15 分間保温した。次いで、緩衝液 A で平衡化したセファデックス G-

25 カラム (1×30 cm) を用いてゲル濾過を行い、AMPD-BSA 複合体を得た。マレイミド基の減少から算出された結合 AMPD 分子数は、BSA 1 分子あたり平均 9.6 分子であった。AMPD-BSA 複合体濃度は 0.579 mg/ml であった。

#### (3) 抗原抗体反応および HRP 活性測定

上記 (2) で得られた AMPD-BSA 複合体 [10 μg/ml 緩衝液 E (0.1% アジ化ナトリウムを含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.5)] を 10 μg/ml BSA 含有緩衝液 E で 300 倍希釈した液 0.15 ml を ELISA 用プレートの各ウェルに加えて 4℃で一夜保温した。該溶液を除き緩衝液 A 0.2 ml で 4 回洗浄した後、緩衝液 B (0.1% BSA 含有緩衝液 A) 0.2 ml を加えて室温で 2 時間保温した。これとは別に、緩衝液 B で系列希釈した標準 FTY720 溶液 75 μl と上記 (1) で得られた HRP 標識 Fab' (5 μg/ml 緩衝液 E を緩衝液 B で 1 nM に希釈) 75 μl を試験管に加えて 4℃で一夜保温した後、該反応混液を上記のプレートに加え、4℃で 6 時間保温した。反応混液を除去し、緩衝液 A 0.25 ml で 4 回洗浄した後、固相中の HRP 活性を実施例 7 の (4) と同様にして測定した。その結果、本アッセイ系の定量可能範囲は 60~10000 pg/ml であった。

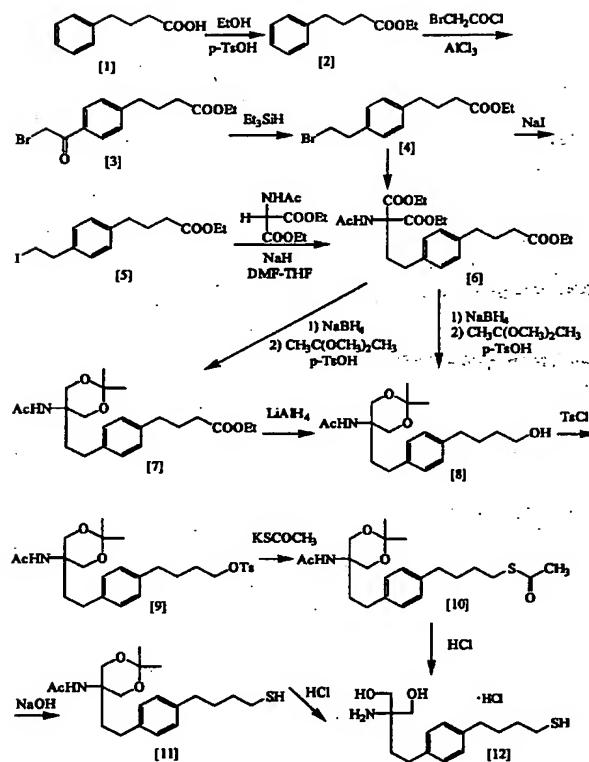
#### 【0086】

【発明の効果】本発明の抗体および免疫測定法を用いれば、簡便且つ高感度に生体試料中の FTY720 物質を検出することができるので、FTY720 物質を投与された臓器移植患者や自己免疫疾患患者における同物質の体内動態を容易にモニタリングでき、移植における拒絶反応の持続的抑制および自己免疫疾患の治療にきわめて有用である。

#### 【図面の簡単な説明】

【図 1】AMPD 合成の全工程を示す図である。

【図 1】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

C 07 C 323/41

C 12 N 5/10

15/02

C 12 P 21/08

G 01 N 33/53

33/531

33/577

// A 61 K 39/00

識別記号

F I

C 07 C 323/41

C 12 P 21/08

G 01 N 33/53

33/531

33/577

A 61 K 39/00

C 12 N 5/00

15/00

G

A

B

H

B

C

(72)発明者 内田 秀治

大阪府豊中市曽根西町4丁目13番2号

(72)発明者 河野 武幸

京都府京都市左京区下鴨宮崎町128-138

(72)発明者 広瀬 良治

兵庫県神戸市長田区東尻池新町1番26号

台糖株式会社研究所内